

小檗碱抑制缺氧诱导的人乳腺癌 HCC1937 细胞自噬

徐兴华^a, 杨梦媛^b, 王中灿^c, 范凯悦^b, 孙城珂^b, 王天宇^b, 王建礼^{a*} (济宁医学院, a.基础医学院, b.临床学院, c.精神卫生学院, 山东 济宁 272067)

摘要: 目的 研究小檗碱(berberine, BBR)对缺氧条件下人乳腺癌 HCC1937 细胞自噬的影响。方法 培养人乳腺癌 HCC1937 细胞, 以 CCK-8 法分别测定常氧及缺氧条件下不同浓度 BBR(0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对细胞活力的影响, 选择用于进一步实验的药物浓度; 将培养的 HCC1937 细胞随机分为 4 组: 对照组, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 组, 缺氧组, 缺氧+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 组。LIVE/DEAD 细胞活力/细胞毒性试剂盒测定细胞死亡率。Western blotting 测定自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 及 P62 的表达。以 mCherry-GFP-LC3 腺病毒感染细胞, 激光共聚焦显微镜成像并计数各组单个细胞内自噬体及自噬溶酶体的数目, 判定 BBR 对 HCC1937 细胞自噬流的影响。结果 BBR 呈浓度依赖性地降低人乳腺癌 HCC1937 细胞的细胞活力; 缺氧处理后 HCC1937 细胞的死亡率无显著改变, 细胞内 Beclin1、LC3-II 及 LC3-II/LC3-I 的比值显著增加, P62 无显著改变, 自噬流增强; 常氧及缺氧条件下 BBR 都能显著增加细胞的死亡率, 降低 Beclin1 及 LC3II/LC3-I 的比值, 增加细胞内 P62, 显著减少自噬体及自噬溶酶体的数量, 抑制自噬体的形成及清除。结论 BBR 增加缺氧条件下人乳腺癌 HCC1937 细胞的死亡率, 其作用与 BBR 抑制缺氧条件下细胞自噬的作用相关。

关键词: 小檗碱; 乳腺癌; 缺氧; HCC1937 细胞; 自噬

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2023)21-2972-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20230600

引用本文:徐兴华, 杨梦媛, 王中灿, 等. 小檗碱抑制缺氧诱导的人乳腺癌 HCC1937 细胞自噬[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(21): 2972-2977.

Berberine Inhibits Hypoxia-induced Autophagy in Human Breast Cancer HCC1937 Cells

XU Xinghua^a, YANG Mengyuan^b, WANG Zhongcan^c, FAN Kaiyue^b, SUN Chengke^b, WANG Tianyu^b, WANG Jianli^{a*} (Jining Medical University, a.College of Basic Medicine, b.School of Clinical Medicine, c.School of Mental Health, Jining 272067, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the effect of berberine(BBR) on autophagy of human breast cancer HCC1937 cells under hypoxia condition. **METHODS** Cultured human breast cancer HCC1937 cells, CCK-8 method was used to determine the effects of different concentrations of BBR(0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on cell viability under normoxia and hypoxia conditions, and select the drug concentration for further experiments. Cultured HCC1937 cells were randomly divided into 4 groups: control group, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR group, hypoxia group, hypoxia+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR group. LIVE/DEAD cell viability/cytotoxicity kits were used to measure the cell death rate. The expressions of autophagy related proteins Beclin1, LC3 and P62 in each group were determined by Western blotting. The cells were infected with mCherry-GFP-LC3 adenovirus, and the number of autophagosomes and autophagolysosomes in each group were counted by laser confocal microscopy to determine the effect of BBR on the autophagy flow of HCC1937 cells. **RESULTS** BBR decreased the cell viability of human breast cancer HCC1937 cells in a concentration-dependent manner. After hypoxia treatment, the cell death rate of HCC1937 cells was not significantly changed, and the intracellular Beclin1, LC3-II and LC3-II/LC3-I ratio were significantly increased, while P62 without significant changes, and the autophagy flow was increased. BBR significantly increased cell death rate, decreased Beclin1 and LC3II/LC3-I ratio, increased intracellular P62, significantly reduced the number of autophagosomes and autophagolysosomes, and inhibited the formation and clearance of autophagosomes under both normal and hypoxia conditions. **CONCLUSION** BBR increases the death rate of human breast cancer HCC1937 cells under hypoxia condition, and its effect is related to the inhibitory effect of berberine on autophagy under hypoxia condition.

KEYWORDS: berberine; breast cancer; hypoxia; HCC1937 cells; autophagy

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤之一^[1], 其中雌激素受体、孕激素受体与酪氨酸激酶受体 2 都为阴性的三阴乳腺癌恶性程度高, 尚无有效的治疗

药物^[2]。细胞自噬过程涉及自噬体的形成及自噬体与溶酶体融合进而降解自噬体内容物, 为细胞在缺氧、缺乏生长因子或营养饥饿条件下的生存提

基金项目: 济宁医学院国家自然科学基金(社会科学)基金培育项目(JYP2019KJ01); 济宁医学院大学生创新训练计划项目(cx2020080)

作者简介: 徐兴华, 女, 硕士, 实验师 E-mail: xuxh123@sohu.com *通信作者: 王建礼, 男, 博士, 副教授 E-mail: wangjianli@mail.

jnmec.edu.cn

供原材料的再利用^[3]。缺氧是实体瘤的一个生理特征,乳腺癌是一种实体瘤,随着肿瘤细胞的生长易引起血流供应相对不足,导致肿瘤局部形成缺氧微环境^[4],缺氧可刺激肿瘤细胞自噬,其自噬水平增加可提高其存活和生长水平,以应对缺氧微环境^[5]。采用药物抑制缺氧所致的乳腺癌细胞自噬,可能发挥抗肿瘤作用。小檗碱(berberine, BBR)是一种苕基异喹啉类生物碱,具有广泛的药理活性^[6-7]。研究发现, BBR 具有抗肿瘤作用,其可通过诱导细胞周期停滞及凋亡进而抑制三阴乳腺癌细胞生长^[8]。其对细胞自噬也会产生影响,但对不同细胞的影响不尽相同,对某些细胞具有促进自噬的作用^[9-10],而对另一些细胞具有抑制自噬的作用^[11-13]。BBR 对缺氧所诱导的肿瘤细胞自噬的影响,尚未见报道。本研究使用人三阴乳腺癌细胞系 HCC1937 细胞,研究 BBR 对缺氧诱导的 HCC1937 细胞自噬的抑制作用,为其抗肿瘤作用提供新的实验依据。

1 仪器与试剂

Heracell VIOS 250i 三气培养箱(Thermo Fisher Scientific); TCS-SP8 SR 激光共聚焦显微镜(徕卡); Mini-Trans Blot 电泳仪及转印系统(BIO-RAD); FluorChem E 化学发光凝胶成像仪(ProteinSimple)。

BBR 购自上海源叶生物科技有限公司,色谱纯,纯度 $\geq 98\%$, 相对分子质量 336.366, 分子式 $C_{20}H_{18}NO_4^+$, 货号: B21379。实验前溶于二甲基亚砜配制成 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储存液, 实验时以 RPMI1640 培养基配成不同浓度的药液。

HCC1937 人乳腺癌细胞[武汉普诺赛(Procell)生命科技有限公司, 货号: CL-0093]; CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司, 货号: C0038); Live/DeadTM 细胞活力/细胞毒性试剂盒(Thermo Fisher Scientific 公司, 货号: L3224); BCA 蛋白浓度测定试剂盒(武汉塞维尔生物科技有限公司, 货号: G2026); LC3 抗体、Beclin1 抗体(Abcam 公司, 货号: ab128025、ab62557); HIF-1 α 抗体、 β -actin 抗体(Cell signaling technology 公司, 货号: #14179、#8457); 羊抗兔二抗(HRP Anti-Rabbit IgG antibody)(Abcam 公司, 货号: ab288151); mCherry-GFP-LC3 腺病毒[汉恒生物科技有限公司, 批号: 21061002; 病毒滴度: $1.26 \times 10^{10} \text{ PFU} \cdot \text{mL}^{-1}$; 感染复数(multiplicity of infection, MOI)值 200]。

2 方法

2.1 细胞培养与实验分组

取对数生长期的 HCC1937 细胞, 于 37°C ,

$5\% \text{ CO}_2$ 细胞培养箱中培养 24 h 后, 使用三气培养箱制备细胞缺氧模型, 缺氧条件为 $5\% \text{ O}_2$, $5\% \text{ CO}_2$, $90\% \text{ N}_2$, 缺氧条件下加入不同浓度的 BBR($0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理细胞 24 h, 以常氧($20\% \text{ O}_2$, $5\% \text{ CO}_2$, $75\% \text{ N}_2$)培养的 HCC1937 细胞作为对照组, 常氧条件下加入不同浓度 BBR($0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)处理细胞 24 h, 用于测定 BBR 对 HCC1937 细胞活力的影响。根据 BBR 对缺氧条件下细胞活力影响的结果, 选取 BBR 浓度为 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行后续 BBR 对细胞自噬的影响研究。实验分组为对照组, 常氧条件下培养 24 h; $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBR 组, 常氧条件下, 培养基中加入 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBR 培养 24 h; 缺氧组, 缺氧条件下培养 24 h; 缺氧+ $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBR 组, 缺氧条件下, 培养基中加入 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBR 培养 24 h; 分别按实验要求培养于培养瓶或培养皿中, 进行后续实验。

2.2 CCK-8 法测定 BBR 对 HCC1937 细胞活力的影响

将细胞接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后, 分别于缺氧和常氧条件下给予不同浓度的 BBR($0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 处理 24 h 后, PBS 洗涤, 加入 CCK-8 检测液, 37°C 孵育 2 h。以酶标仪测定 450 nm 处的光密度值, 以常氧条件下 BBR 浓度为 0 的组所得的光密度值作为对照, 以该光密度值的均数对应的细胞活力值为 100%, 以其他各组所得的光密度值与该光密度值的比值算得其他各组的细胞活力值。

2.3 LIVE/DEAD 细胞活力/细胞毒性试剂盒测定细胞死亡率

将细胞接种于 12 孔板内, 按实验分组处理细胞, PBS 洗涤后, 加入终浓度为 $4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的乙锭同源二聚体-1 和 $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的钙黄绿素 AM 染色液约 100 μL , 室温下 15 min 后, 以荧光显微镜分别观察激发光波长为 485 nm 和 530 nm 处的荧光, 并拍照。活细胞内酯酶有活性, 钙黄绿素-AM 能进入细胞内与其结合发出绿色荧光; 乙锭同源二聚体-1 不能透过活细胞的细胞膜, 细胞死亡时膜完整性丧失, 其可进入细胞内与核苷酸结合发出红色荧光。每组选取 10 个视野, 计数绿色荧光点(存活细胞)个数与红色荧光点(死亡细胞)个数, 根据公式: 细胞死亡率=死亡细胞数/(存活细胞数+死亡细胞数) $\times 100\%$, 计算细胞死亡率。

2.4 Western blotting 检测自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 及 P62 的表达情况

按分组情况处理细胞后,以 RIPA 裂解细胞,提取总蛋白。以 BCA 法测定蛋白浓度,每组各取 30 μg 总蛋白上样,SDS-PAGE 电泳,然后转至 PVDF 膜上,4 $^{\circ}\text{C}$ 下封闭 4 h,加入 1:1 000 稀释的抗体,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗涤后再加入相应的二抗,室温孵育 1 h。洗涤后,加入化学发光试剂,以发光成像系统采集图像,采用 Image J 软件测定条带的积分光密度值,以 β -actin 作为内参,以目的蛋白条带的光密度值与 β -actin 的光密度值的比值,表示目的蛋白的相对表达水平。

2.5 以表达 mCherry-GFP-LC3 融合蛋白的双标腺病毒感染细胞测定自噬流

将细胞接种于激光共聚焦显微镜专用玻底培养皿中,以表达 mCherry-GFP-LC3 融合蛋白的腺病毒感染 HCC1937 细胞,平均每个细胞 MOI 值为 100。感染后,培养 12 h。然后按分组情况处理。处理结束后,以 4%多聚甲醛固定 30 min。以 DAPI 染细胞核,然后使用激光扫描共聚焦显微镜观察并拍照。GFP 发绿色荧光,其对酸敏感,自噬体与溶酶体融合后其发生淬灭;mCherry 发红色荧光,对酸不敏感,用于标记及追踪 LC3,自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体后不会淬灭,红色的斑点指示自噬溶酶体。红、绿荧光 merge 后出现的黄色斑点即为自噬体,通过不同颜色斑点的计数了解自噬流的情况。

2.6 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行统计学分析,计量资料数据呈正态分布,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度 BBR 对乳腺癌 HCC1937 细胞活力的影响

以 CCK-8 法测定不同浓度 BBR 对 HCC1937 细胞活力的影响,见图 1。与常氧条件下对照组(0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBR 组)相比,缺氧条件下 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBR 组 HCC1937 细胞活力无明显改变。常氧条件与缺氧条件下,与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBR 组相比,10, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBR 组细胞活力差异都具有统计学意义($P < 0.05$),且细胞活力随 BBR 浓度的增加有下降的趋势。与常氧条件

下相比,在 BBR 浓度为 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可显著降低缺氧条件下 HCC1937 细胞的活力 [(76.26 $\pm$ 2.94)% vs (68.39 $\pm$ 2.31)%, $P < 0.05$]。基于此,后续实验中观察 BBR 对缺氧条件下自噬的影响,采用 BBR 浓度为 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为实验浓度。

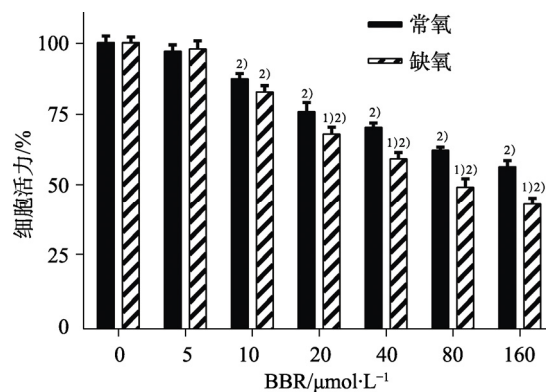


图1 常氧及缺氧条件下小檗碱对 HCC1937 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

与常氧组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBR 组相比, ²⁾ $P < 0.05$ 。

Fig. 1 Effects of berberine on cell viability of HCC1937 under normoxia and hypoxia conditions($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Compared with normoxia group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with 0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBR group, ²⁾ $P < 0.05$.

3.2 BBR 对缺氧条件下乳腺癌 HCC1937 细胞死亡率的影响

以 LIVE/DEAD 细胞活力/细胞毒性试剂盒测定各组 HCC1937 细胞的死亡率,见图 2。对照组与缺氧组之间 HCC1937 细胞的死亡率无显著差异,20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBR 组细胞死亡率显著高于对照组 (15.61% vs 1.44%, $P < 0.05$);缺氧+20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BBR 组细胞死亡率显著增加(27.03% vs 1.75%, $P < 0.05$)。另外,缺氧条件下 BBR 所致细胞死亡率显著高于常氧条件下(27.03% vs 15.61%, $P < 0.05$)。表明 BBR 对处于缺氧状态下的 HCC1937 细胞具有更大的杀伤作用。

3.3 BBR 对 HCC1937 细胞自噬相关蛋白 Beclin1、LC3 及 P62 的影响

为确定缺氧体系建立成功,采用 Western blotting 测定各组细胞内 HIF-1 α 的表达情况。为确定 BBR 对缺氧条件下自噬的影响,采用 Western blotting 测定自噬体形成相关蛋白 Beclin1、LC3 及 P62 的表达情况,见图 3。缺氧组细胞内 HIF-1 α 的表达量比对照组增加 61.38%($P < 0.05$),表明缺氧模型建立成功。细胞自噬活性增强时,Beclin1 的表达增加。缺氧组 Beclin1 比对照组增加约

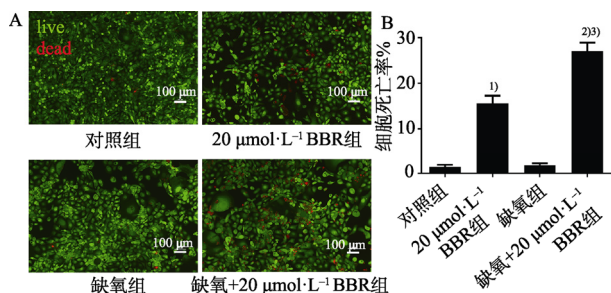


图 2 小檗碱对 HCC1937 细胞死亡率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=10$)
A-钙黄绿素 AM 和乙锭同源二聚体-1 染色的 HCC1937 细胞荧光显微镜图(bar: 100 μm), 活细胞(绿色), 死细胞(红色); B-细胞死亡率柱状图。与对照组相比, ¹ $P < 0.05$; 与缺氧组相比, ² $P < 0.05$; 与 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 组相比, ³ $P < 0.05$ 。

Fig. 2 Effect of berberine on the death rate of HCC1937 cells($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

A-fluorescence microscope image of HCC1937 cells stained with calcein AM and ethidium homodimer-1 (bar: 100 μm), live cells(green), dead cells (red); B-histogram of cell death rate. Compared with control group, ¹ $P < 0.05$; compared with hypoxia group, ² $P < 0.05$; compared with 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR group, ³ $P < 0.05$.

71.76%($P < 0.05$), 表明缺氧状态下 HCC1937 细胞的自噬活性增强; 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 组 Beclin1 比对照组降低约 10.51%($P < 0.05$), 表明常氧条件下 BBR 可抑制细胞自噬。与缺氧组相比, 缺氧+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 组 Beclin1 降低 25.65% ($P < 0.05$)。表明 BBR 能够抑制缺氧诱导的 HCC1937 细胞的自噬活性。自噬体形成时, LC3-I 会酶解掉一小段多肽, 转变为 LC3-II, LC3-II/LC3-I 的比值与自噬活性成正相关; 自噬体清除过程中, LC3-II 与 P62 也因降解而减少, 因此, 通常同时观察 LC3 与 P62 的改变来判断自噬流。与对照组相比, 缺氧组 LC3-II 的表达量增加 62.42%($P < 0.05$), LC3-II/LC3-I 的比值增加 137.32%($P < 0.05$), P62 无显著改变。与对照组相比, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 组 LC3-II 的表达量无显著改变, 而 LC3-II/LC3-I 的比值下降

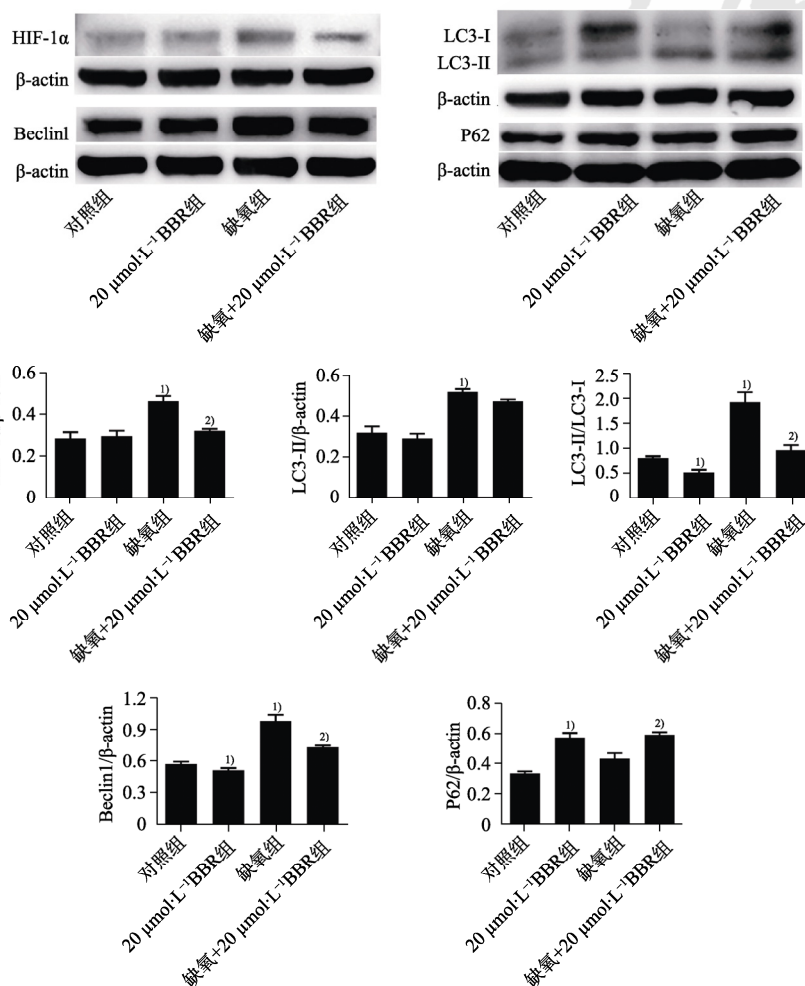


图 3 小檗碱对缺氧条件下 HCC1937 细胞内自噬相关蛋白的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
与对照组相比, ¹ $P < 0.05$; 与缺氧组相比, ² $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Effects of berberine on autophagy associated proteins in HCC1937 cells under hypoxia condition($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Compared with control group, ¹ $P < 0.05$; compared with hypoxia group, ² $P < 0.05$.

约 36.09% ($P < 0.05$), 同时 P62 增加 71.65% ($P < 0.05$); 与缺氧组相比, 缺氧+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 组 LC3-II 的表达量无显著改变, LC3-II/LC3-I 的比值降低 49.92% ($P < 0.05$), P62 增加 36.74% ($P < 0.05$)。表明缺氧可促进 HCC1937 细胞自噬的活性, BBR 可抑制常氧及缺氧条件下细胞的自噬活性。

3.4 BBR 对缺氧 HCC1937 细胞自噬流的影响

为进一步观察 BBR 对 HCC1937 细胞自噬流的影响, 以表达 mCherry-GFP-LC3 的腺病毒感染细胞, 通过计数细胞内自噬体与自噬溶酶体数目的变化, 判定 BBR 对缺氧所致的 HCC1937 细胞自噬流的影响, 见图 4。与对照组相比, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 组细胞内自噬体数量减少 (15.33 ± 2.08 vs 22.0 ± 3.60 , $P < 0.05$), 缺氧组细胞内自噬体数量增加 (32.33 ± 2.52 vs 22.0 ± 3.60 , $P < 0.05$); 与缺氧组相比, 缺氧+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 组细胞内自噬体数量减少 (18.67 ± 1.52 vs 32.33 ± 2.52 , $P < 0.05$); 与对照组相比, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 组细胞内自噬溶酶体数量减少 (7.33 ± 1.52 vs 12.67 ± 2.08 , $P < 0.05$), 缺氧组细胞内自噬溶酶体数量增加 (36.67 ± 4.16 vs 12.67 ± 2.08 , $P < 0.05$); 与缺氧组相比, 缺氧+20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 组细胞内自噬溶酶体数量减少 (7.67 ± 1.15 vs 36.67 ± 4.16 , $P < 0.05$)。表明常氧条件下 BBR 可抑制 HCC1937 细胞的自噬流, 且在缺氧条件下, BBR 对 HCC1937 细胞自噬流的抑制作用更强。

4 讨论

三阴乳腺癌恶性程度高, 预后较差, 其具体的分子病理生理机制尚不清楚, 目前对于非转移性三阴乳腺癌主要以化疗为主, 但耐药性强、复发率高, 尚无有效的治疗药物^[2]。本研究中所采用的 HCC1937 人乳腺癌细胞系来源于原发性导管癌, BRCA1 分析表明它是 BRCA1 5382C 突变纯合, ERBB2 及雌激素和孕激素受体都呈阴性, 属于三阴乳腺癌细胞系。有研究发现, 肿瘤细胞自噬的增强还参与其耐药性的发生^[14], 合用自噬抑制剂能降低三阴乳腺癌细胞对抗肿瘤药物的耐药性, 增强化疗药物的敏感性^[15-17]。而多数自噬抑制剂都有较强的不良反应, 因此从不良反应较少的中草药中发掘能够抑制缺氧条件下肿瘤细胞自噬的抗肿瘤药物具有重要意义。

早期研究发现, BBR 对多种革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌有抑制作用, 对肠道感染和细菌性痢疾有效, 所以最初 BBR 主要用于临床治疗消化

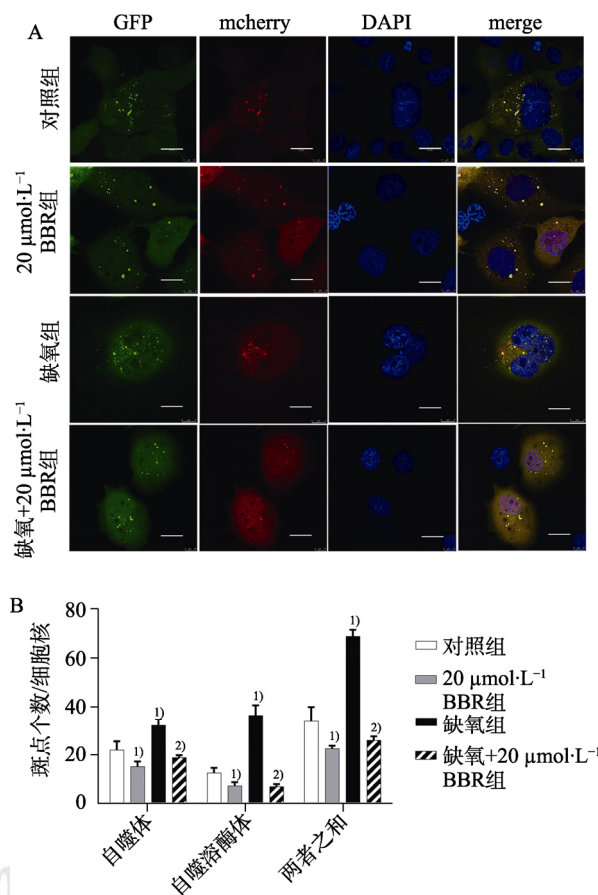


图 4 小檗碱对缺氧 HCC1937 细胞自噬流的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

A-激光共聚焦显微镜成像结果, 合并图片中的斑点分别表示自噬体(黄色)和自噬溶酶体(红色), 细胞核以 DAPI 染色(蓝色), bar: 20 μm ; B-细胞内自噬体、自噬溶酶体及其总和的定量分析结果。与对照组相比, ¹) $P < 0.05$; 与缺氧组相比, ²) $P < 0.05$ 。

Fig. 4 Effect of berberine on autophagy flow in hypoxic HCC1937 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

A-confocal microscopy images, punctate dots in the images of the merge indicate the autophagosome(yellow) and autophagolysosome(red), respectively, the nucleus was stained by DAPI(blue), bar: 20 μm ; B-Quantitative analysis results of intracellular autophagosome, autophagolysosome and the sum of them. Compared with control group, ¹) $P < 0.05$; compared with hypoxia group, ²) $P < 0.05$.

道疾病如肠胃炎和细菌性痢疾^[18]。既往研究发现 BBR 具有抑制某些细胞自噬的作用^[19]。BBR 还可通过靶向多条通路引起结肠癌细胞的细胞周期阻滞、抑制炎症和诱导凋亡, 其也能诱导前列腺癌细胞产生活性氧并激活线粒体依赖性的凋亡^[20]。然而, 其抗肿瘤作用的研究基本都限于体外实验, 与其生物利用度非常低有关, 这也限制了其在临床上的应用^[21], 因此提高 BBR 口服生物利用度的方法也是将来的研究重点。

本研究发现缺氧条件下 HCC1937 细胞活力并未降低, 而其自噬能力明显增强, BBR 能抑制缺氧条件下 HCC1937 细胞的自噬, 并增加其细胞死

亡率。该研究结果将为进一步研究 BBR 与其他抗肿瘤药物联合使用, 通过其抑制自噬而增强其他抗肿瘤药物的敏感性奠定了基础。另外, BBR 在人体内发挥作用的分子机制尚未完全揭示, 对人体的具体靶点和作用机制尚不清楚, 还需更深入的研究来支持 BBR 的临床应用。

REFERENCES

- [1] LOIBL S, POORTMANS P, MORROW M, et al. Breast cancer[J]. *Lancet*, 2021, 397(10286): 1750-1769.
- [2] WAKS A G, WINER E P. Breast cancer treatment: A review[J]. *JAMA*, 2019, 321(3): 288-300.
- [3] MIZUSHIMA N. Autophagy: Process and function[J]. *Genes Dev*, 2007, 21(22): 2861-2873.
- [4] HARRIS A L. Hypoxia: A key regulatory factor in tumour growth[J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(1): 38-47.
- [5] AMARAVADI R, KIMMELMAN A C, WHITE E. Recent insights into the function of autophagy in cancer[J]. *Genes Dev*, 2016, 30(17): 1913-1930.
- [6] RAUF A, ABU-IZNEID T, KHALIL A A, et al. Berberine as a potential anticancer agent: A comprehensive review[J]. *Molecules*, 2021, 26(23): 7368.
- [7] YU H, DU J L. Research progress on pharmacological effect and mechanism action of berberine[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2020, 37(4): 501-507.
- [8] KHALKI L E, MAIRE V, DUBOIS T, et al. Berberine impairs the survival of triple negative breast cancer cells: Cellular and molecular analyses[J]. *Molecules*, 2020, 25(3): 506.
- [9] JIN Y L, LIU S P, MA Q S, et al. Berberine enhances the AMPK activation and autophagy and mitigates high glucose-induced apoptosis of mouse podocytes[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017(794): 106-114.
- [10] ZHENG Y H, KOU J Y, WANG P Y, et al. Berberine-induced TFEB deacetylation by SIRT1 promotes autophagy in peritoneal macrophages[J]. *Aging*, 2021, 13(5): 7096-7119.
- [11] XIE P, REN Z K, LV J, et al. Berberine ameliorates oxygen-glucose deprivation/reperfusion-induced apoptosis by inhibiting endoplasmic reticulum stress and autophagy in PC12 cells[J]. *Curr Med Sci*, 2020, 40(6): 1047-1056.
- [12] LUO Y P, HUANG Z Y, ZHANG H Z, et al. Research advances on autophagy mechanism of bidirectional regulation by berberine[J]. *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2022, 31(1): 46-52.
- [13] WANG Y, LIU Y F, DU X Y, et al. Berberine reverses doxorubicin resistance by inhibiting autophagy through the PTEN/akt/mTOR signaling pathway in breast cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2020(13): 1909-1919.
- [14] MELE L, DEL VECCHIO V, LICCARDO D, et al. The role of autophagy in resistance to targeted therapies[J]. *Cancer Treat Rev*, 2020(88): 102043.
- [15] COCCO S, LEONE A, ROCA M S, et al. Inhibition of autophagy by chloroquine prevents resistance to PI3K/AKT inhibitors and potentiates their antitumor effect in combination with paclitaxel in triple negative breast cancer models[J]. *J Transl Med*, 2022, 20(1): 290.
- [16] ZHOU N, LIU Q Y, WANG X, et al. The combination of hydroxychloroquine and 2-deoxyglucose enhances apoptosis in breast cancer cells by blocking protective autophagy and sustaining endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Death Discov*, 2022, 8(1): 286.
- [17] ZHANG S, DONG Y, CHEN X P, et al. Toosendanin, a late-stage autophagy inhibitor, sensitizes triple-negative breast cancer to irinotecan chemotherapy[J]. *Chin Med*, 2022, 17(1): 55.
- [18] RABBANI G H, BUTLER T, KNIGHT J, et al. Randomized controlled trial of berberine sulfate therapy for diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*[J]. *J Infect Dis*, 1987, 155(5): 979-984.
- [19] PANG H, ZHOU Y T, WANG J, et al. Berberine influences the survival of fat grafting by inhibiting autophagy and apoptosis of human adipose derived mesenchymal stem cells[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021(15): 4795-4809.
- [20] PARK S H, SUNG J H, KIM E J, et al. Berberine induces apoptosis via ROS generation in PANC-1 and MIA-PaCa₂ pancreatic cell lines[J]. *Revista Brasileira De Pesquisas Med E Biol*, 2015, 48(2): 111-119.
- [21] ZHOU J X, WU S G, GONG J B, et al. Pharmacological activities of berberine and strategies to improve its oral bioavailability[J]. *Acta Pharm Sin*(药学报), 2022, 57(5): 1263-1272.

收稿日期: 2023-03-09
(本文责编: 李艳芳)